

MEASURING METHOD AND KIT FOR TARTARIC ACID-RESISTANT ACID PHOSPHATASE

Reference 4

Patent number: JP2002031640

Publication date: 2002-01-31

Inventor: MIYAZAKI SHUICHI; IGARASHI MAKOTO

Applicant: YAMASA SHOYU KK

Classification:

- international: G01N33/573; C12Q1/42; G01N33/577; C07K16/40; C12N9/16; C12N15/02; C12N15/09; C12P21/08

- european:

Application number: JP20000216167 20000717

Priority number(s): JP20000216167 20000717

[View INPADOC patent family](#)

Abstract of JP2002031640

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method and a kit wherein a tartaric acid-resistant acid phosphatase in a sample can be measured by immunoassay. **SOLUTION:** In the method which measures the tartaric acid-resistant acid phosphatase in the sample is measured by the immunoassay. In the measuring method for the tartaric acid-resistant phosphatase, an antibody which immunizes a recombinant tartaric acid-resistant phosphatase which is originated from an osteosarcoma cell is used as an antibody, and the recombinant tartaric acid-resistant acid phosphatase which is originated from the osteosarcoma cell is used as a standard substance.

Reference 4

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-31640

(P2002-31640A)

(43) 公開日 平成14年1月31日 (2002.1.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
G 0 1 N 33/573		C 0 1 N 33/573	A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/42		C 1 2 Q 1/42	4 B 0 5 0
G 0 1 N 33/577		G 0 1 N 33/577	B 4 B 0 6 3
// C 0 7 K 16/40		C 0 7 K 16/40	4 B 0 6 4
C 1 2 N 9/16		C 1 2 N 9/16	A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-216167 (P2000-216167)

(22) 出願日 平成12年7月17日 (2000.7.17)

(71) 出願人 000006770

ヤマサ醤油株式会社

千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1

(72) 発明者 宮崎 修一

千葉県銚子市上野町192-5

(72) 発明者 五十嵐 誠

千葉県銚子市南小川町4117-3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの測定法およびキット

(57) 【要約】

【課題】 サンプル中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) をイムノアッセイにより測定するための方法およびキットを提供する。

【解決手段】 サンプル中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼをイムノアッセイにより測定する方法において、抗体として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫して得られた抗体を使用し、標準物質として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを使用することを特徴とする酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの測定法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サンプル中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼをイムノアッセイにより測定する方法において、抗体として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫して得られた抗体を使用し、標準物質として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを使用することを特徴とする酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの測定法。

【請求項2】 骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼが、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子を骨肉腫由来培養細胞からクローニングし、バキュロウィルスベクターに組み込んだ後、昆虫細胞により発現させて得たものである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 サンプル中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼをイムノアッセイにより測定するためのキットであって、抗体として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫して得られた抗体を使用し、標準物質として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを使用することを特徴とする酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ測定用キット。

【請求項5】 骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼが、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子を骨肉腫由来培養細胞からクローニングし、バキュロウィルスベクターに組み込んだ後、昆虫細胞により発現させて得たものである、請求項4記載のキット。

【請求項6】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項4記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、サンプル中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) をイムノアッセイにより測定するための方法およびキットに関するものである。

【0002】

【従来の技術】酸性ホスファターゼは、至適pHを酸性に持ち、有機モノリン酸エステルの加水分解反応を触媒する酵素である。生体内の酸性ホスファターゼとしては、前立腺由来酸性ホスファターゼ、破骨細胞由来酸性ホスファターゼ、赤血球由来酸性ホスファターゼ、血小板由来酸性ホスファターゼなどの種々の細胞由来のものが知られており、酒石酸の添加によっても酵素活性が阻害されない酸性ホスファターゼを酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼと称している。血清中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼは、その大部分が破骨細胞由来のものであるため、当該酵素の測定は破骨細胞の機能を評価するた

めの指標、たとえば骨吸収のマーカーとして有用であると考えられている (日本臨床, 57, 188-191, (1999))。

【0003】従来、血清中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの測定としては、酵素活性を測定する方法が一般的であるが、最近、抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体を用いたEIAなどの免疫学的測定法も報告されている。上記免疫学的測定法における抗体作製のための抗原あるいは標準物質としては、ヒトの骨あるいは脾臓から精製した酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ、あるいはヒト胎盤から酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの遺伝子をクローニングし、昆虫細胞で発現させて得た組換え (リコンビナント) 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼが用いられている (J Bone Miner Res, 11, 1444-1452(1996)、J Clin Endocrinol Metab 71, 442-451(1990)、Clin Chem 35, 86-89(1989)、Clin Chem, 44, 221-225(1998)、Clin Chem 41, 1495-1499 (1995))。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従来の酵素活性測定法は、溶血検体での赤血球由来あるいは血小板由来の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの影響、さらに吸光度測定時の血中のビリルビン等の色素により影響を受け、特異性、感度の点で問題があった (Calcif Tissue Int, 64, 301-303, (1999))。

【0005】一方、免疫学的測定法は、酵素活性測定法よりは特異性に優れた方法ではあるが、標準物質として組織からの精製品を用いているため、キットの安定供給の点で問題があった。また、胎盤からクローニングしたリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを標準物質に用いれば、上記安定供給の問題は克服されるものの、胎盤由来の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼと骨由来の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼとではN-末アミノ酸配列に違いがあることが報告されており (Biochem Biophys Res Commun 168, 792-800(1990))、この違いに起因するものであるかどうかは不明ではあるものの、従来の免疫学的測定法は、感度の高い蛍光標識抗体を用いた場合であっても測定感度が十分ではなく、血清成分の影響を受ける可能性もあり、必ずしも満足し得る方法ではなかった。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記免疫学的測定法における問題点を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、骨肉腫由来培養細胞から酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子をクローニングに成功し、宿主として昆虫細胞を用いて発現させて得たリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを抗体を取得するための抗原あるいは測定時の標準物質として使用することによりサンプル中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを特異的、かつ感度よく測定できることを知見し、本発明を完成させた。

【0007】したがって、本発明は、サンプル中の酒石

酸抵抗性酸性ホスファターゼをイムノアッセイにより測定する方法において、抗体として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫して得られた抗体を使用し、標準物質として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを使用することを特徴とする酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの測定法に関するものである。

【0008】また、本発明は、サンプル中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼをイムノアッセイにより測定するためのキットであって、抗体として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫して得られた抗体を使用し、標準物質として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを使用することを特徴とする酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ測定用キットに関するものである。

【0009】

【発明の実施の形態】骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの調製は、ヒト胎盤からの当該遺伝子のクローニング、クローニングした遺伝子の塩基配列およびクローニングした遺伝子を用いた昆虫細胞での発現が既に報告されており (J. Biol. Chem., 269, 1294-1300 (1994))、この公知の方法に準じて行うことができる。具体的には、ヒト骨肉腫由来培養細胞としては、Saos-2 (大日本製薬 (株) から入手可能) などを使用することができる。この骨肉腫由来培養細胞を常法により培養し、培養細胞よりDNAまたはRNAを抽出する。RNAを抽出した場合には、逆転写酵素を持ちいて逆転写反応を行った後、既にクローニングされている酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの塩基配列を参考に適当なプライマーを作成し、PCR法にて酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子を増幅する。

【0010】次に、増幅された遺伝子を転移用のベクターに組み込み、既にクローニングされている酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの塩基配列を参考に酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子が増幅されていることを確認後、この転移ベクターとバキュロウイルスDNAとを昆虫細胞にコートランスフェクトして組換え型バキュロウイルスを調製し、この組換え型バキュロウイルスを昆虫細胞に感染させて、その培養上清からリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを常法 (たとえば、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法など) により単離精製すればよい。なお、転移ベクターの調製、昆虫細胞へのコートランスフェクション、昆虫細胞の感染など、バキュロウイルスを用いた一連の手法は、1980年代にテキサス大学で開発され、当業者において広く認知されている公知の手法であり、すべて常法に従って行うことができる (特開平5-284975など参照)。

【0011】このようにして調製した骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫原として使用し、常法により動物に免疫し、ポリクロー

ナル抗体またはモノクローナル抗体を取得する。たとえば、モノクローナル抗体を取得する場合には、上記の骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼをマウスに免疫し、2週間おきに3~4回の追加免疫を行い、摘出したマウスの脾細胞とミエロマ細胞とを細胞融合し、得られたハイブリドーマよりリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングする。次に、得られたハイブリドーマを用いて腹水を形成させるなどの常法によりモノクローナル抗体を産生させ、当該抗体を各種クロマトグラフィー法で精製し、本発明の方法およびキットに使用する。

【0012】本発明の測定法は、前述したように、抗体として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫して得られた抗体を使用し、標準物質として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを使用することを特徴としており、測定手順などは公知の方法またはそれに準じて行うことができる。

【0013】すなわち、使用する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体のいずれの抗体であってもよい。また、抗体そのものでもよいが、活性フラグメントを使用することもできる。活性フラグメントとしては、 $F(ab')_2$ 、 Fab' 、 Fab などの各種フラグメントで、測定上の機能が失われていないものであればよい。これら活性フラグメントの調製は、精製抗体に対してパパイン、ペプシン、トリプシン処理などの公知の方法を適用することで行うことができる (例えば、「免疫生化学研究法 (続生化学実験講座5)」、日本生化学会編、89頁 (1986年) 参照)。

【0014】このようにして調製された抗体またはその活性フラグメントは、必要により選択した測定方法に適した形態に修飾し、本発明に使用する。抗体の修飾は、それぞれ常法に従って行うことができる。例えば、固相化抗体を調製する場合、使用できる担体の材質としては、抗体との結合性の高いものであれば特に制限されず、例えば、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、スチレン-無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレンなどの合成有機高分子化合物、デキストラン誘導体 (セファデックスなど)、アガロースゲル (セファロース、バイオゲルなど)、セルロース (ペーパーディスク、濾紙など) などの多糖類、ガラス、シリカゲル、シリコンなどの無機高分子化合物が挙げられ、これらはアミノ基、アミノアルキル基、カルボキシル基、アシル基、水酸基などの官能基を導入したものであってもかまわない。

【0015】担体の形状としては、マイクロタイタープレート、ディスクなどの平板状、ビーズなどの粒子状、

試験管、チューブなどの管状、その他繊維状、膜状などが例示され、測定法に応じて適宜選択することができる。固相担体への抗体の固定化は、物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法、包括法など公知の方法を用いて行えばよい。このようにして得られた固相試薬は、非特異的結合を抑制するために、BSA、糖、スキムミルクなどの通常のブロッキング剤を用いてブロッキング処理を施してもかまわない。

【0016】また、標識化抗体または標識化抗原を調製する場合、使用する標識体としては、放射性同位体 (^{32}P 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I など)、酵素 (β -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)、補酵素・補欠分子族 (FAD、FMN、ATP、ビオチン、ヘムなど)、蛍光色素 (フルオレセイン誘導体、ローダミン誘導体など)、金属粒子 (金、銀、白金など) などを使用することができる。抗体または抗原の標識化は、選択した標識剤に適した公知の方法 (例えば「続生化学実験講座5免疫生化学研究法」(株)東京化学同人、(1986年発行)第102~112頁参照) に従って行えばよい。また、アビジン-ビオチン等を用いて抗体または抗原を標識することもできる。

【0017】測定手順としては、競合法、凝集法など公知の手順のいずれであってもよい。採用した測定手順の具体的な操作法に関しては、たとえば下記の文献を参照することができる。

(a) 入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(株)講談社、昭和54年5月1日発行)

(b) 石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)
(株)医学書院、1982年12月15日発行)

(c) 臨床病理 臨時増刊 特集第53号「臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」(臨床病理刊行会、1983年発行)

(d) 「バイオテクノロジー事典」(株)シーエムシー、1986年10月9日発行)

【0018】(e) 特公平6-43998号公報、特開昭55-15100号公報、特開昭52-148620号公報及び特開昭54-91296号公報

(f) 「Methods in ENZYMOLOGY Vol.70」(Immunochemical techniques (Part A))

(g) 「Methods in ENZYMOLOGY Vol.73」(Immunochemical techniques (Part B))

(h) 「Methods in ENZYMOLOGY Vol.74」(Immunochemical techniques (Part C))

(i) 「Methods in ENZYMOLOGY Vol.84」(Immunochemical techniques (Part D: Selected Immunoassay))

(j) 「Methods in ENZYMOLOGY Vol.92」(Immunochemical techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))

[(f)~(j)はアカデミックプレス社発行]

【0019】測定対象のサンプルとしては、酒石酸抵抗

性酸性ホスファターゼを含有するものであれば特に制限されない。そのようなサンプルを具体的に例示すれば、尿、血清等を例示することができ、特に血清サンプルが使用に好適である。

【0020】このような公知の測定手順の中からサンドイッチ法を例に挙げて本発明方法を具体的に説明すれば、固相化抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体に対し、サンプル中の遊離の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを反応させ、固相と液相を分離 (BF分離) する。さらに標識化抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体と反応させた後、BF分離し、固相の標識量を測定することでサンプル中の遊離の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを検出または定量することができる。

【0021】本発明のキットも、少なくとも、抗体として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫して得られた抗体を使用し、標準物質として骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを使用することを特徴としており、その他の構成試薬は測定法に準じて適宜添付すればよい。たとえば、サンドイッチ法を例に挙げ、本発明のキットの構成試薬を具体的に説明すれば、たとえば次のものが例示される。

① 固相化抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体

② 標識化抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体

③ リコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (標準物質)

この構成試薬において、たとえば、標識として西洋ワサビペルオキシダーゼを用いる場合には、上記試薬の他に、必要により、発色試薬、酵素反応停止用試薬、サンプル希釈用試薬なども構成試薬としてキットに添付すればよい。

【0022】

【発明の効果】骨肉腫細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを調製し、これを標準物質あるいは抗体作成のための抗原として使用することにより、胎盤細胞由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを使用する従来法と比較して約10倍以上の高感度のアッセイ系を構築することが初めて可能となった。

【0023】

【実施例】以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、これにより本発明は何等限定されるものではない。

実施例

<方法>

(1) リコンビナントヒト酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼの調製

骨肉腫由来培養細胞Saos-2を培養し、AGPC法 (実験医学、vol. 9, No. 15 (11月号) p99~112) によって全RNAを抽出・調製した。調製

した全RNAを鋳型として、反応液20 μ l (50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.3)、100mM 塩化カリウム、4mM DTT、4mM 塩化マグネシウム、1mM dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、1U/ μ l RNase Inhibitor、0.15 μ M オリゴdTプライマー、1 μ g Saos-2由来全RNA、0.25U/ μ l 逆転写酵素含有) 中で逆転写反応を55℃で30分間行い、相補DNA (cDNA) を合成した。続いてその反応液をそのまま鋳型として、下記の2種類のプライマーを用いてPCR法にてヒト酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子 (trap gene) を増幅した。

【0024】

プライマー (a) : 5'-CCCTG GATGG ACATG TGGAC G-3'

プライマー (b) : 5'-TCGGG CCTCA GAGCT GGGCA G-3'

【0025】PCRによるヒト酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子の増幅は、上記反応液20 μ l に別に調製した反応液80 μ l を添加して調製した反応液100 μ l 中 (20mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)、50mM 塩化カリウム、2.5mM 塩化マグネシウム、200 μ M dNTP (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、1mM DTT、プライマーDNA (a) 及び (b) 各0.2 μ M、Taq DNAポリメラーゼ 0.025U/ μ l) をTaKaRa社製PCR Thermal Cycler PERSONALを用いて、94℃、2分間の熱処理後、熱変性 (94℃、30秒)、アニーリング (55℃、30秒)、ポリメライゼーション (72℃、1分) のステップを50回繰り返すことにより行った。

【0026】遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム (1:1) 混合液で処理し、水溶性画分に2倍容のエタノールを添加してDNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、約1kb相当のDNA断片を精製後、T4 DNAポリメラーゼで末端の平滑化及びリン酸基の付加を行った。この断片の両端へBamHIリンカーを付加した後に昆虫細胞用の転移ベクターpAcYM1のBamHI部位へ挿入し、挿入断片の塩基配列を決定し、得られた断片が酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子であることを確認した。作製した組み換えプラスミドDNAとバキュロウィルスDNAをリボソームを用いて昆虫細胞Sf9へコトランスフェクションし、数日培養した後に培養上清を適宜に希釈してSf9細胞へ感染させ、軟寒天培地を重層してプラークを形成させた。

【0027】この操作を繰り返して組み換えウィルスの単離・純化を行い、純化した組み換えウィルスをSf9細胞へ感染させて、ウィルスを増幅を行った。同時に培養上清中の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ活性を測定し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子が発現していることを確認した。ウィルスのタイターを10⁸ p f

u/ml以上まで上昇させ、得られた培養上清を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ遺伝子を持つ組み換えウィルス液とした。このウィルス液を用いて1細胞あたり10倍程度のウィルス量になるようにSf9細胞に感染させ、細胞が10⁷個あたり10mlの無血清培地を添加し、27℃で4日から1週間培養して酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを培養上清中へ産生させた。得られた昆虫細胞培養上清をイオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過にアプライし、骨肉腫由来のリコンビナントヒト酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを精製し、測定時の標準物質あるいは抗体作製時の抗原として使用した。

【0028】(2) 抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体の調製

上記リコンビナントヒト酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを免疫原として使用し、常法によりマウスに免疫した。2週間おきに3~4回追加免疫を行い、摘出したマウスの脾細胞とミエロマ細胞Sp2/O-Ag14 (大日本製薬(株)から入手可能) を細胞融合し、得られたハイブリドーマより酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ15A4および13B9を選出した。得られたハイブリドーマから常法によりモノクローナル抗体を産生させ、各種クロマトグラフィー法で精製して抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体とした。

【0029】(3) 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体の調製

過ヨウ素酸法 (Immunofluorescence and Related Staining Techniques, Elsevier/North-Holland Biomedical Press社 pp215-224(1978)) によりFab'化した抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体 (13B9) と西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲートして西洋ワサビペルオキシダーゼ標識化抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体とした。

【0030】(4) 抗体の固相化とブロッキング

抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体 (15A4) 溶液 (10 μ g/ml: リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) で調製) を96穴プレート (NUNC Immunomodule C8 Maxisorp) に100 μ l/ウエル分注し、4℃で一晩反応させた。抗体液を吸引除去後、リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) で洗浄し、ブロッキング溶液 (スキムミルク含有リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4)) を300 μ l/ウエル分注し、室温で1時間インキュベート後、ブロッキング溶液を除去し、乾燥させて固相化抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体 (抗体固相化プレート) とした。

【0031】(5) 測定手順

上記 (4) で調製した抗体固相化プレートに、測定用サンプルを100 μ l/ウエル分注して、室温で2時間反応させた。反応後リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) にてウエルを洗浄し、次に上記 (3) で調製した西洋ワ

サビペルオキシダーゼ標識化抗酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ抗体を25 ng/mlになるように加えた溶液を100 µl/ウェル分注して、室温で1時間反応させた。反応後リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) にてウェルを洗浄し、TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine) 溶液を100 µl/ウェル分注して発色させる。最後に、1 N硫酸を100 µl/ウェル分注して反応を停止させ、450 nmの吸光度を測定した。

【0032】<結果>

(6) 反応曲線

上記測定手順に従い、ヒトリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ溶液を用いて反応曲線を作成した (図1)。図1から明らかなように、従来報告されてい

る胎盤由来のリコンビナント酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを用いた方法では測定限界が1 ng/mlであったのに対し、本発明法では0.078 ng/mlまで測定することが可能となり、従来法よりも測定感度の点で約10倍高感度な優れた測定系を構築することが確認された。

【0033】(7) 希釈直線性

上記測定手順に従い、健常人血清 (3種) を段階希釈したときの測定値をプロットした結果、良好な希釈直線性を示すことが明らかとなった (図2)。

【0034】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> YAMASA CORPORATION
<120> Method of assaying tartrate resistant acid phosphatase and kit
therefor
<130> YP2000-015
<140>
<141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for amplification of trap gene
<400> 1
ccctggatgg acatgtggac g                               21
<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for amplification of trap gene
<400> 2
tcgggcctca gagctgggca g                               21

```

【0035】

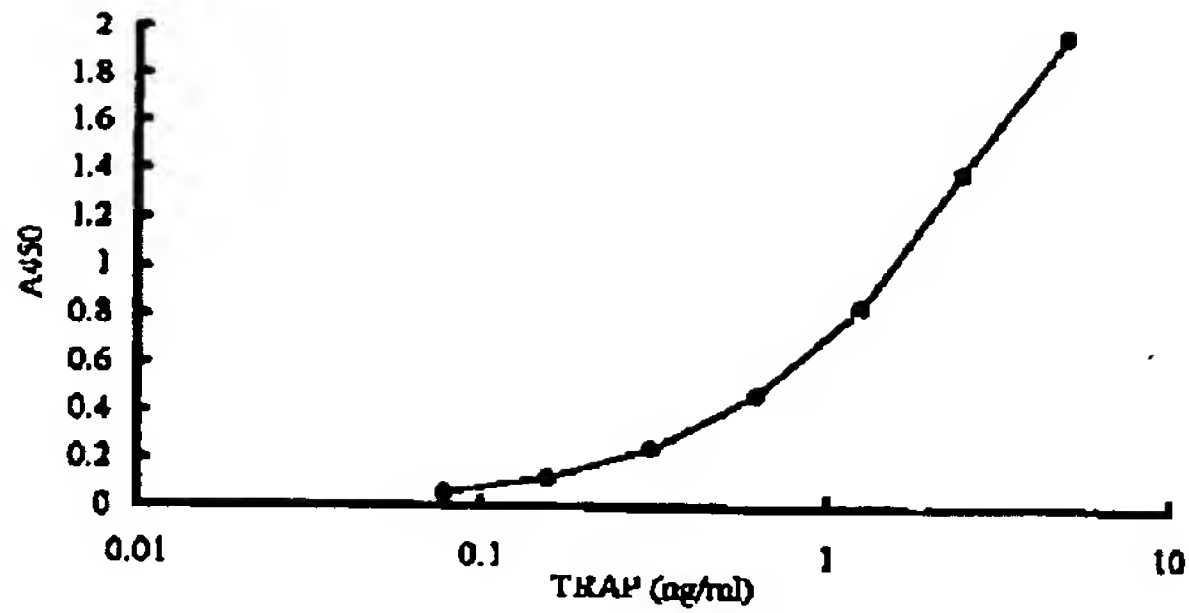
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、骨肉腫由来のリコンビナントヒト酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) を用いて本発

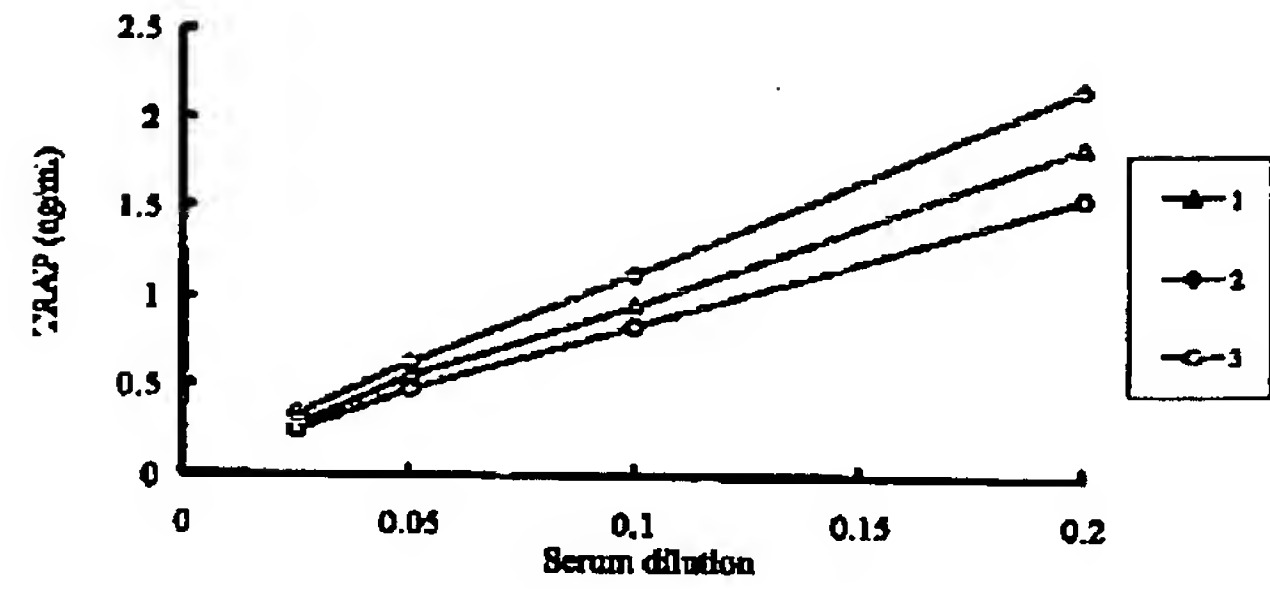
明法 (サンドイッチ法) による反応曲線を作製したときの結果を示したものである。

【図2】図2は、本発明法における健常人血清での希釈直線性の結果を示したものである。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

(参考)

C 1 2 N 15/02

C 1 2 P 21/08

15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

C

C 1 2 P 21/08

Z N A A

Fターム(参考) 4B024 BA11 CA04 DA02 EA02 EA04

GA13 HA01

4B050 CC03 DD11 LL03 LL05

4B063 QA01 QA08 QQ02 QQ33 QR02

QR13 QR24 QR48 QR84 QS03

QS33 QX02

4B064 AG01 AG27 CA10 CA19 CA20

CC24 CE10 CE11 DA13

4H045 AA11 AA30 CA41 DA76 DA86

EA50 FA72 FA74 GA21 GA23